

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 4 月 12 日 (12.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/25404 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 5/06 // A61N 7/00, A61P 19/08

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04146

(22) 国際出願日: 2000 年 6 月 23 日 (23.06.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/284075 1999 年 10 月 5 日 (05.10.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 帝人株式会社 (TEIJIN LIMITED) [JP/JP]; 〒541-0054 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 東 由明 (AZUMA, Yoshiaki) [JP/JP]; 〒191-0065 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内 Tokyo (JP). 太田知裕 (OHTA, Tomohiro) [JP/JP].

小森谷恵司 (KOMORIYA, Keiji) [JP/JP]; 〒100-0011 東京都千代田区内幸町2丁目1番1号 帝人株式会社内 Tokyo (JP). 工藤 明 (KUDO, Akira) [JP/JP]; 〒186-0005 東京都国立市西1丁目15番20号 Tokyo (JP). 竹下 淳 (TAKESHITA, Sunao) [JP/JP]; 〒242-0001 神奈川県大和市下鶴間2129-3 ライオンズマンションつきみ野2-904号 Kanagawa (JP). 梶 圭介 (KAJI, Keisuke) [JP/JP]; 〒226-0027 神奈川県横浜市緑区長津田4丁目9番6号 ホドガヤビル108号 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 前田純博 (MAEDA, Sumihiro); 〒100-0011 東京都千代田区内幸町2丁目1番1号 帝人株式会社 知的財産センター内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, US.

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHODS FOR INHIBITING OSTEOCLAST FORMATION OR METHODS FOR INHIBITING BONE RESORPTION

(54) 発明の名称: 破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法

(57) Abstract: A method for inhibiting the formation of osteoclasts or a method for inhibiting bone resorption characterized by effecting UV irradiation in an incubation system containing osteoclast precursor cells and inducers in a liquid medium; or a method for inhibiting the formation of osteoclasts or a method for inhibiting bone resorption characterized by effecting UV irradiation in a co-incubation system containing osteoclast precursor cells and inducers in a liquid medium.

(57) 要約:

培養液中に破骨細胞前駆細胞と誘導因子類とを含む培養系において、超音波を照射することを特徴とする破骨細胞形成抑制方法もしくは骨吸収抑制方法、または培養液中に破骨細胞前駆細胞を含む共存培養系において、超音波を照射することを特徴とする破骨細胞形成抑制方法もしくは骨吸収抑制方法。

WO 01/25404 A1

## 明 細 書

破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法

## 5 技術分野

本発明は、破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法に関する。

さらに詳しくは、超音波（以下「US」ということがある。）を照射することを特徴とする破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法に関する。

## 背景技術

従来、破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法としては、たとえば、共存培養系にビスホスホネート類を添加する方法等が知られていた[Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA eds. Principales of bone biology Academic Press, New York (1996)]。臨床的には、破骨細胞形成または骨吸収を抑制する医薬品が、破骨細胞による骨吸収に基づく骨関連疾患治療に使われていた[Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA eds. Principales of bone biology Academic Press, New York (1996)]。

しかしながら、これら薬剤あるいは医薬品を添加あるいは投与する方法は、体内あるいは細胞内に直接取り込まれ、常に副作用の危険を伴うことが問題とされていた。従って、このような副作用の危険性の少ない破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法が求められていた。

そこで、本発明者らはこのような副作用の危険性の少ない破骨

細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法をみいだすべく鋭意研究を行ったところ、物理的・非浸襲的な超音波刺激により、破骨細胞形成または骨吸収を抑制することができることを見出し本発明に到達した。

5

#### 発明の開示

すなわち、本発明は、培養液中に破骨細胞前駆細胞と誘導因子類とを含む培養系において超音波を照射することを特徴とする破骨細胞形成抑制方法もしくは骨吸収抑制方法、または、培養液中  
10 に破骨細胞前駆細胞を含む共存培養系において、超音波を照射することを特徴とする破骨細胞形成抑制方法もしくは骨吸収抑制方法を提供するものである。

#### 図面の簡単な説明

15 図 1 は、マウス破骨細胞前駆細胞から sRANKL によって形成された破骨細胞数を示したものであり、破骨細胞数の経時変化を示したものである。

図 2 は、マウス破骨細胞前駆細胞とマウス骨髄ストローマ細胞株との共存培養によって形成された 96 時間後の破骨細胞数を示  
20 したものである。

図 3 は、マウス破骨細胞前駆細胞とマウス骨髄ストローマ細胞株との共存培養によって形成された 120 時間後の破骨細胞数を示したものである。

図 4 は、マウス破骨細胞前駆細胞とマウス骨髄ストローマ細胞  
25 株との共存培養によって形成された破骨細胞による骨吸収面積を示したものである。

各図に共通して、

\*はStudent'sの t 検定の結果、対照群に対して、 $p < 0.05$ であることを表す。

\*\*\*はStudent'sの t 検定の結果、対照群に対して、 $p < 0.001$ であることを表す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明で用いられる破骨細胞前駆細胞としては、培養液中に含まれる誘導因子類によって破骨細胞が形成されるもの、または培養液中において他の破骨細胞形成支持能を有する支持細胞と共存せしめることにより破骨細胞が形成されるものである。この破骨細胞前駆細胞としては、骨髓由来前駆細胞、脾臓由来前駆細胞、末梢血単球由来前駆細胞等が挙げられる。該細胞は、ヒト、マウス等の骨髓、脾臓、もしくは末梢血より入手可能であり、破骨細胞前駆細胞培養用の培地を用いて培養、継代して得ることができる。

ここで、破骨細胞前駆細胞に作用して破骨細胞を形成せしめる誘導因子類としては、マクロファージコロニー刺激因子（以下「M-CSF」という。）、破骨細胞形成因子（RANKL/TRANCE/ODF/OPGL、以下「RANKL」という。）、腫瘍壊死因子（以下「TNF」という。）インターロイキン-4（IL-4）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）から選ばれる少なくとも一種であり、これらは一種のみ用いてもいいし、数種類用いてもよい。この中でもRANKLを用いることが好ましく、特に人工的に作製された可溶性のRANKLを、濃度1～250ng/mlで用いることが好ましい。これら、誘導因子類

の培養液への添加時期は、破骨細胞前駆細胞を播き込んだ直後から、破骨細胞が形成されるまでである。

共存培養系に含まれる破骨細胞前駆細胞以外の細胞としては、骨芽細胞、ストローマ細胞、線維芽細胞、T細胞、B細胞から選  
5 ばれる少なくとも一種を挙げることができ、これらは一種のみ用いてもいいし、数種類用いてもよい。

更に、該共存培養系の培養液中に、誘導因子類を含むことが好ましい。ここで用いられる該誘導因子類としては、前記M-CSF、RANKL、TNF、IL-4、VEGFの他にインターロイキン-1（以下「IL-  
10 1」という。）、インターロイキン-3（以下「IL-3」という。）、インターロイキン-6（以下「IL-6」という。）、インターロイキン-11（以下「IL-11」という。）、インターロイキン-15（以下「IL-15」という。）、インターロイキン-17（以下「IL-17」という。）、プロスタグランジンE2等のプロ  
15 スタグランジン類（以下「PG」という。）、副甲状腺ホルモン（以下「PTH」という。）、副甲状腺ホルモン関連ペプチド（以下「PTHrP」という。）、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（以下「GM-CSF」という。）、 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミンD3等の活性型ビタミンD類（以下「VD」という。）を挙げること  
20 とができ、これらから選ばれる少なくとも一種もしくは数種類を用いることができる。

上記誘導因子類の中では、RANKLを用いることが特に好ましい。これは、RANKLが生体内における破骨細胞形成に必須の因子であり、骨の代謝・維持に重要な役割を果たしている[Takahashi N,  
25 et al. Biochem Biophys Res Comm 256: 449-455 (1999)]からである。RANKLは、生体内では破骨細胞形成を支持する細胞、

例えば骨芽細胞、ストローマ細胞、線維芽細胞等の細胞表面に存在し、破骨細胞前駆細胞が有する受容体 (RANK/TRANCER/ODFR) と結合することによって、破骨細胞形成を誘導する [Takahashi N, et al. Biochem Biophys Res Comm 256: 449-455 (1999)]。生体内では、RANKLは可溶性因子としては存在していないことから、共存培養による破骨細胞形成系は、生体内の環境により近い評価システムであると考えられる。RANKLは、正常下での骨代謝に重要な役割を果たしているが、骨関連疾患とも深く関わっている。例えば閉経後骨粗鬆症においては、破骨細胞の数と骨吸収活性が増加し骨量が減少するが、この時の破骨細胞の形成にはRANKLの増加が関与していると考えられている [Kong YY, et al. Nature 397: 315-323 (1999)]。RANKLとRANKLの結合を妨げる生体内分子である破骨細胞形成抑制因子 (以下「OPG/OCIF」という。) は、RANKLによって誘導される破骨細胞の形成を誘導するとともに、破骨細胞の形成亢進・破骨細胞の活性亢進に基づく骨関連疾患の動物モデルにおいて、例えば高カルシウム血症モデル、骨粗鬆症モデルにおいて、破骨細胞の形成を抑制し、骨吸収活性を抑制することによって、骨量低下や血清カルシウム濃度の増加といった症状を改善することが明らかになっている [Lacey DL, et al. Cell 93: 165-176 (1998)]。このように、RANKLあるいはRANKLを誘導するような因子が関与することによって生ずる破骨細胞形成促進、ならびに骨吸収促進が関与すると考えられている骨関連疾患、例えば骨粗鬆症、慢性関節リウマチの骨量減少または骨破壊、人工関節置換術直後の骨減少、人工関節置換術後のルーズニング、骨転移した腫瘍による骨破壊などに対して、RANKLによる破骨細胞誘導あるいは骨吸収亢進の抑制は、該骨関連疾患の治

療法として応用が期待される。

本発明における共存培養系とは、破骨細胞前駆細胞と少なくとも一種の破骨細胞形成支持能を有する細胞とを同じ培地内で培養する方法をいう。ここで、破骨細胞形成支持能を有する細胞としては、骨芽細胞、ストローマ細胞、線維芽細胞、T細胞、B細胞  
5 から選ばれる少なくとも一種を挙げることができ、これらは一種のみ用いてもよいし、数種類用いてもよい。この中でストローマ細胞を用いることが好ましく、更に骨髓由来ストローマ細胞を用いることが好ましい。破骨細胞前駆細胞との組み合わせとしては、骨髓由来の破骨細胞前駆細胞と骨髓由来のストローマ細胞と  
10 を組み合わせることが最も好ましい。骨髓由来ストローマ細胞としては、マウス骨髓ストローマ細胞として、ST-2、TSB-13-9等が挙げられる。

該ST-2の入手方法としては、アメリカンタイプカルチャーコレクションより入手可能であり、以下に詳述する培地により培養、  
15 継代して実験に供することができる。

本発明で用いられる破骨細胞前駆細胞培養用の培養液としては、8～1000ng/mlのM-CSFを含み、5%～15%ウシ胎児血清を添加したアルファMEM培地等が挙げられる。なかでも、100ng/mlのM-CSFを含み、10%ウシ胎児血清を添加したアルファMEM培地を用いることが  
20 好ましい。

共存培養系で用いられる培養液としては、前記誘導因子類、5%～15%ウシ胎児血清等を添加したアルファMEM培地等が挙げられ、特に、 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ～ $1 \times 10^{-7} \text{M}$ の範囲の $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン  
25 D3と10%ウシ胎児血清とを添加したアルファMEM培地を用いることが好ましい。これら誘導因子類を培地に添加する時期としては、

破骨細胞前駆細胞と骨髄由来ストローマ細胞等の破骨細胞形成支持能を有する細胞とを同時に巻き込み、破骨細胞が形成されるまで添加することができる。

本発明で照射される超音波とは、熱を発生しないような低出力の超音波をいう。具体的には、周波数1.3~2MHz、繰り返し周波数100~1000kHz、パース幅10~2000 $\mu$ sec、出力100mW/cm<sup>2</sup>以下の低出力超音波である。該超音波の照射方法としては、例えば、1日20分間低出力超音波パルスを用いて、培養ウエルの底面に伝わるようにし、連続3日~5日間照射する。照射条件としては、例えば、超音波出力の特性としてパース幅200 $\mu$ sec、周波数1.5MHz、1kHzの繰り返し周波数、出力30mW/cm<sup>2</sup>で行うことが好ましい。

本発明の超音波を照射するための超音波発生装置としては特に規定はないが、例えば、臨床応用する場合等には、Duarteの米国特許（No. 4,530,360）に記載されているような患部に近接した体外より経皮的に超音波のパルスを適用することができる基礎的な非浸襲的治療装置等を用いることができる。その装置から発生される超音波は、周波数1.3~2MHz、繰り返し周期100~1,000Hz、パース幅10~2000 $\mu$ sec、出力100mW/cm<sup>2</sup>以下の低出力超音波である。また、その照射時期は1日20分以内とすることが好ましい。また、Talish他の米国特許（No. 5,003,965）によって遠隔制御ユニットに接続されたボディ・アプリーケーター・ユニットを有する超音波体治療システムを用いることができる。この場合の超音波は、周波数1.3~2MHz、出力1~50mW/cm<sup>2</sup>の低出力超音波である。

本発明の破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法を応用し、



- 超音波を、破骨細胞形成もしくは骨吸収亢進に基づく骨減少または骨破壊が起こっている患部に照射することにより、骨関連疾患、例えば骨粗鬆症、慢性関節リウマチの骨量減少もしくは骨破壊、人工関節置換術直後の骨減少、人工関節置換術後のルーズニング、
- 5 骨転移した腫瘍による骨破壊等の治療に向けての臨床応用が可能となる。更に、本発明の破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法は、従来問題となっていた薬剤等の投与による副作用の危険性が少ないものであり、今後の臨床応用が期待される。

## 10 実施例

以下に本発明を実施例により説明する。

### 実施例 1-1 ~ 1-4 および比較例 1-1 ~ 1-4

- マウス骨髄由来破骨細胞前駆細胞（以下「MDBM」という。）は、
- 15 マウスの大腿骨および脛骨の骨髄を採取した後、常法により単球成分のみを分離し、 $4 \times 10^6$ 個/10cm-dishに播き込んで接着性細胞のみを100 ng/mlのM-CSF存在下で3日間培養することにより得た。培地には、100ng/mlのM-CSFを含み、10%ウシ胎児血清を添加したアルファMEM培地を用いた。MDBMを $1 \times 10^5$ 個/wellの密度で6穴ウ
- 20 エルに2mlの量で播いた。ここに、可溶性RANKL（以下「sRANKL」という。）を50ng/mlになるように添加した。sRANKLは、Pepro-Tech社より入手したものを用いた。実験は以下の群を設定した。

比較例 1-1 ; 対照群（コントロール）の72時間培養群

実施例 1-1 ; 超音波照射群の72時間培養群

- 25 超音波を1日20分間、連続2日間ウエルの底面より照射した。

比較例 1 - 2 ; 対照群 (コントロール) の 96 時間培養群

実施例 1 - 2 ; 超音波照射群の 96 時間培養群

超音波を 1 日 20 分間、連続 3 日間ウエルの底面より照射した。

5 比較例 1 - 3 ; 対照群 (コントロール) の 108 時間培養群

実施例 1 - 3 ; 超音波照射群の 108 時間培養群

超音波を 1 日 20 分間、連続 4 日間ウエルの底面より照射した。

比較例 1 - 4 ; 対照群 (コントロール) の 144 時間培養群

10 実施例 1 - 4 ; 超音波照射群の 144 時間培養群

超音波を 1 日 20 分間、連続 5 日間ウエルの底面より照射した。

sRANKL の添加に関しては、比較例および実施例ともに、滅菌蒸留水で  $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度に溶解したものを、200 倍希釈で  $50\text{ng/ml}$  になるように添加した。3 日目に比較例および実施例ともに  $50\text{ng/ml}$  の sRANKL を含んだ新鮮な 10%FCS- $\alpha$  MEM に交換した。

超音波の照射に関しては、比較例 1 - 1 ~ 1 - 4 では、超音波は照射せず、実施例 1 - 1 ~ 1 - 3 では 1 日 20 分間低出力超音波パルス、Exogen 社の超音波出力ユニットを細胞照射用に改変したものを用いて、ウエル底面より実施例 1 - 1 では連続 2 日間、実施例 1 - 2 では連続 3 日間、実施例 1 - 3 では連続 4 日間、実施例 1 - 4 では連続 5 日間照射した。ここで、超音波の出力特性は、バースト幅  $200 \mu\text{sec}$ 、超音波周波数  $1.5 \text{ MHz}$ 、 $1 \text{ kHz}$  の繰り返し周波数、出力  $30 \text{ mW/cm}^2$  で行った。

25 比較例 1 - 1 および実施例 1 - 1 では培養開始 72 時間後、比較例 1 - 2 および実施例 1 - 2 では培養開始 96 時間後、比較例 1 -

- 3 および実施例 1 - 3 では培養開始108時間後、比較例 1 - 4 および実施例 1 - 4 では培養開始144時間後に培地を除去し、細胞をリン酸緩衝ホルマリンで固定し、常法に従って破骨細胞のマーカである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行い、
- 5 光学顕微鏡下で、10核以上の細胞核を有するTRAP陽性多核細胞を破骨細胞として、その数を測定した。

結果を図 1 に記載した。図 1 から明らかな通り、実施例 1 - 2 ~ 1 - 4 における破骨細胞数は、比較例 1 - 2 ~ 1 - 4 に比べて減少している。

10

#### 実施例 2 - 1 ~ 2 - 2 および比較例 2 - 1 ~ 2 - 2

- MDBMは、マウスの大腿骨および脛骨の骨髓を採取した後、常法により単球成分のみを分離し、 $4 \times 10^6$ 個/10cm-dishに播き込んで接着性細胞のみを100 ng/mlのM-CSF存在下で3日間培養すること
- 15 により得た。培地には、100ng/mlのM-CSFを含み、10%ウシ胎児血清を添加したアルファMEM培地を用いた。マウス骨髓由来ストローマ細胞株TSB-13-9は、SV-40-large-T-antigen transgenic miceの骨髓より樹立した細胞株である。TSB-13-9は、 $2 \times 10^5$  個/10cm-dishに播き込んで3日間培養したものを使用した。培地には、
- 20 10%ウシ胎児血清を添加したアルファMEM培地を用いた。

MDBMは $1 \times 10^5$ 個/wellの密度で、TSB-13-9は $1 \times 10^6$ 個/wellの密度で、同時に 6 穴ウェルに2mlの量で播いた。ここに、 $1 \times 10^{-8}$ Mの $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミンD3を添加した。実験は以下の群を設定した。

- 25 比較例 2 - 1 ; 対照群 (コントロール) の96時間培養群  
実施例 2 - 1 ; 超音波照射群の96時間培養群

超音波を1日20分間、連続3日間ウエルの底面より照射した。

比較例 2 - 2 ; 対照群 (コントロール) の120時間培養群

実施例 2 - 2 ; 超音波照射群の120時間培養群

5 超音波を1日20分間、連続4日間ウエルの底面より照射した。

1 $\alpha$ , 25-ジヒドロキシビタミンD3の添加に関しては、比較例および実施例ともに、エタノールで $1 \times 10^{-5}$ Mの濃度に溶解したものを、1000倍希釈で $1 \times 10^{-8}$ Mになるように添加した。3日目に比較例  
10 および実施例ともに $1 \times 10^{-8}$ Mの1 $\alpha$ , 25-ジヒドロキシビタミンD3を含んだ新鮮な10%FCS- $\alpha$  MEMに交換した。

超音波の照射に関しては、比較例 1 - 1 ~ 1 - 2 では、超音波は照射せず、実施例 1 - 1 ~ 1 - 2 では1日20分間低出力超音波パルスを、Exogen社の超音波出力ユニットを細胞照射用  
15 に改変したものをを用いて、ウエル底面より実施例 1 - 1 では連続3日間照射し、実施例 1 - 2 では連続4日間照射した。ここで、超音波の出力特性は、バースト幅200  $\mu$  sec、超音波周波数1.5 MHz、1 kHzの繰り返し周波数、出力30 mW/cm<sup>2</sup>で行った。

比較例 1 - 1 および実施例 1 - 1 では培養開始96時間後、比較  
20 例 1 - 2 および実施例 1 - 2 では培養開始120時間後に培地を除去し、細胞を10%リン酸緩衝ホルマリンで固定し、常法に従って破骨細胞のマーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (以下「TRAP」という。) 染色を行い、光学顕微鏡下で、10核以上の細胞核を有するTRAP陽性多核細胞を破骨細胞として、その数を測  
25 定した。結果を図1に記載した。

図2および図3から明らかな通り、実施例 1 - 1 ~ 1 - 2 にお

ける破骨細胞数は、比較例 1 - 1 ~ 1 - 2 に比べて減少している。

### 実施例 3 - 1 および比較例 3 - 1

実施例 1 と同様の方法で調製した MDBM を  $2 \times 10^4$  個/well の密度  
5 で 24 穴 ウェル に 1 ml の量で播いた。24 穴 ウェル には、あらかじめ骨吸収活性測定用のハイドロキシアパタイトコーティングディスク (Osteologic, Millennium Biologix, Inc.) を入れておき、この上に細胞が生着するようにした。sRANKL を 50 ng/ml になるように添加した。sRANKL は、Pepro-Tech 社より入手したものを用いた。  
10 た。

実験は以下の群を設定した。

比較例 3 - 1 ; 対照群 (コントロール) の 120 時間培養群

実施例 3 - 1 ; 超音波照射群の 120 時間培養群

超音波を 1 日 20 分間、連続 4 日間 ウェルの底  
15 面より照射した。

sRANKL の添加に関しては、比較例および実施例ともに、滅菌蒸留水で  $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度に溶解したものを、200 倍希釈で 50 ng/ml になるように添加した。3 日目に比較例および実施例ともに 50 ng/ml の sRANKL を含んだ新鮮な 10% FCS- $\alpha$  MEM に交換した。

20 超音波の照射に関しては、比較例 3 - 1 では、超音波は照射せず、実施例 3 - 1 では 1 日 20 分間低出力超音波パルスを用いて、ウェル底面より実施例 3 - 1 では連続 4 日間照射した。ここで、超音波の出力特性は、バースト幅  $200 \mu\text{sec}$ 、超音波周波  
25 数 1.5 MHz、1 kHz の繰り返し周波数、出力  $30 \text{ mW/cm}^2$  で行った。

比較例 3 - 1 および実施例 3 - 1 では培養開始 120 時間後に培

地を除去し、ハイドロキシアパタイトコーティングディスクを取り出した。蒸留水で洗浄後、光学顕微鏡下で破骨細胞によるハイドロキシアパタイトの溶解状態を観察した。ディスクの一部（全体面積の50%以上）を画像取り込み装置によりコンピュータに取り込み、溶解された面積を画像解析ソフトを用いて測定した。全体面積あたりの溶解された面積を計算し、破骨細胞による骨吸収面積として図3に記載した。

図3から明らかな通り、実施例3-1における破骨細胞による骨吸収面積は、比較例3-1に比べて減少している。

10

#### 実施例4-1および比較例4-1

実施例2と同様の方法で、MDBMとマウス骨髄由来ストローマ細胞株TSB-13-9を準備した。培地には、10%ウシ胎児血清を添加したアルファMEM培地を用いた。

15     MDBMは $2 \times 10^4$ 個/wellの密度で、TSB-13-9は $1 \times 10^5$ 個/wellの密度で、24穴ウエルに同時に播いた。培地量は最終的に1mlに調整した。24穴ウエルには、あらかじめ骨吸収活性測定用のハイドロキシアパタイトコーティングディスク（Osteologic, Millenium Biologix, Inc.）を入れておき、この上に細胞が生着するようにした。ここに、最終濃度 $1 \times 10^{-8}$ Mとなるように $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミンD3を添加した。

20

実験は以下の群を設定した。

比較例4-1； 対照群（コントロール）の120時間培養群

実施例4-1； 超音波照射群の120時間培養群

25

超音波を1日20分間、連続4日間ウエルの底面より照射した。

1  $\alpha$ , 25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>の添加に関しては、比較例および実施例ともに、エタノールで $1 \times 10^{-8}$ Mの濃度に溶解したものを、1000倍希釈で $1 \times 10^{-8}$ Mになるように添加した。3日目に比較例および実施例ともに $1 \times 10^{-8}$ Mの $1 \alpha$ , 25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>を含んだ新鮮な10% FCS- $\alpha$  MEMに交換した。

超音波の照射に関しては、比較例4-1では、超音波は照射せず、実施例4-1では1日20分間低出力超音波パルスを用いて、Exogen社の超音波出力ユニットを細胞照射用に改変したものを、ウエル底面より実施例4-1では連続4日間照射した。

10 ここで、超音波の出力特性は、バースト幅200  $\mu$  sec、超音波周波数1.5 MHz、1 kHzの繰り返し周波数、出力30 mW/cm<sup>2</sup>で行った。

比較例4-1および実施例4-1では培養開始120時間後に培地を除去し、ハイドロキシアパタイトコーティングディスクを取り出した。蒸留水で洗浄後、光学顕微鏡下で破骨細胞によるハイドロキシアパタイトの溶解状態を観察した。ディスクの一部（全体面積の50%以上）を画像取り込み装置によりコンピュータに取り込み、溶解された面積を画像解析ソフトを用いて測定した。全体面積あたりの溶解された面積を計算し、破骨細胞による骨吸収面積として図4に記載した。

20 図4から明らかな通り、実施例4-1における破骨細胞による骨吸収面積は、比較例4-1に比べて減少している。

本発明は、超音波を照射することを特徴とする破骨細胞形成または骨吸収の抑制方法であり、このような物理的・非浸襲的な超音波を、破骨細胞形成もしくは骨吸収亢進に基づく骨減少または骨破壊が起こっている患部に照射することにより、副作用の危険性がなく、骨関連疾患、例えば骨粗鬆症、慢性関節リウマチの骨

- 量減少もしくは骨破壊、人工関節置換術直後の骨減少、人工関節置換術後のルーズニング、骨転移した腫瘍による骨破壊等の治療に向けての臨床応用が可能となる。更に、本発明の破骨細胞形成または骨吸収の抑制方法は、従来問題となっていた薬剤等の投与
- 5 による副作用の危険性が少ないものであり、今後の臨床応用が期待される。



## 請 求 の 範 囲

1. 培養液中に破骨細胞前駆細胞と誘導因子類とを含む培養系において、超音波を照射することを特徴とする破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法。
2. 該誘導因子類が、マクロファージコロニー刺激因子、破骨細胞形成因子、腫瘍壊死因子、インターロイキン-4、血管内皮細胞増殖因子から選ばれる少なくとも一種である請求の範囲第1項記載の破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法。
- 10 3. 培養液中に破骨細胞前駆細胞を含む共存培養系において、超音波を照射することを特徴とする破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法。
4. 該共存培養系に含まれる細胞が、骨芽細胞、ストローマ細胞、線維芽細胞、T細胞、B細胞から選ばれる少なくとも一種である請求項3記載の破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法。
- 15 5. 該共存培養系の培養液中に誘導因子類を含む請求の範囲第3項または第4項記載の破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法。
6. 該誘導因子類が、マクロファージコロニー刺激因子、破骨細胞形成因子、腫瘍壊死因子、インターロイキン-1、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-6、インターロイキン-11、インターロイキン-15、インターロイキン-17、プロスタグランジン類、副甲状腺ホルモン、副甲状腺ホルモン関連ペプチド、血管内皮細胞増殖因子、顆粒球・マ
- 20 クロファージコロニー刺激因子、活性型ビタミンD類から選ばれる少なくとも一種である請求の範囲第5項記載の破骨細胞形成抑
- 25

制方法または骨吸収抑制方法。

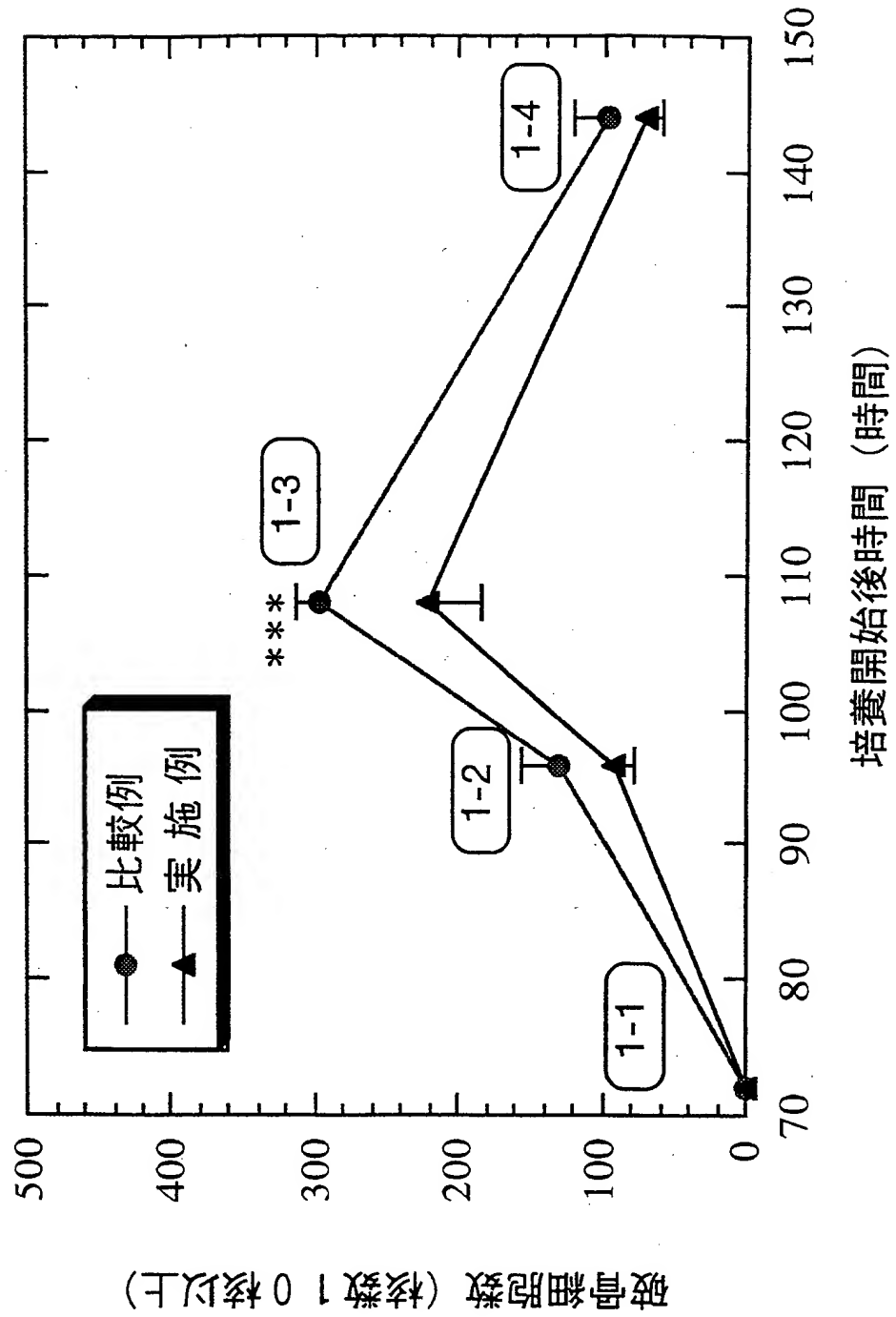


図 1

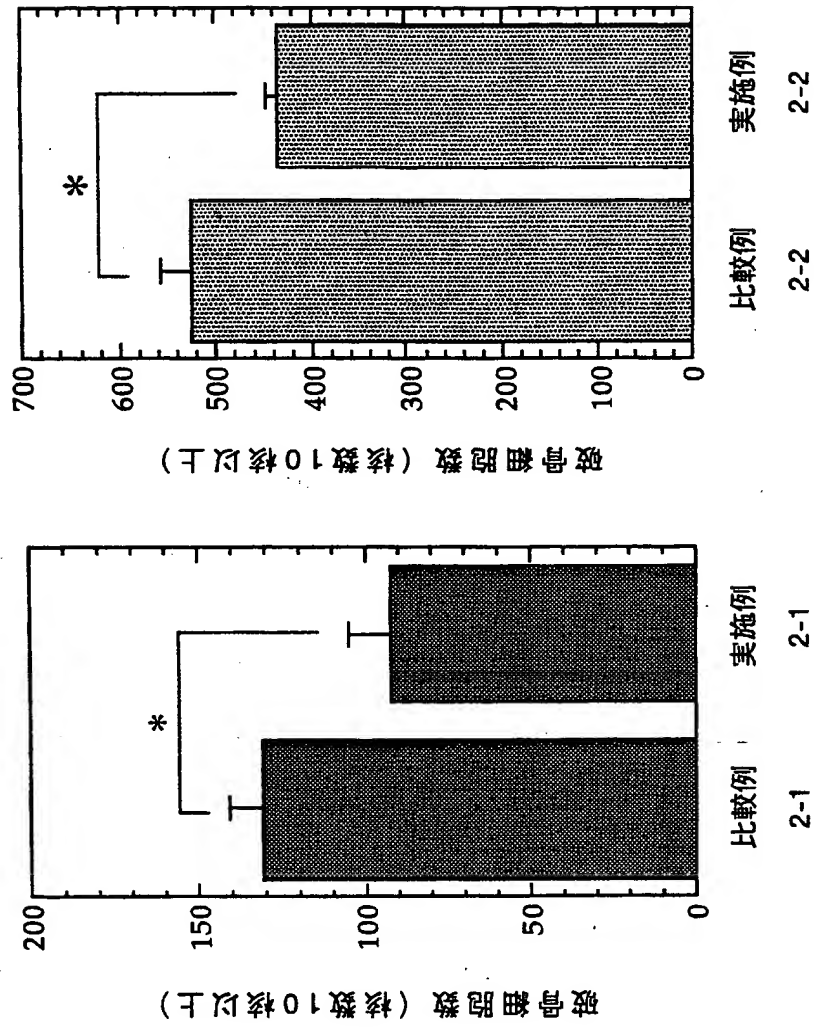


図 2

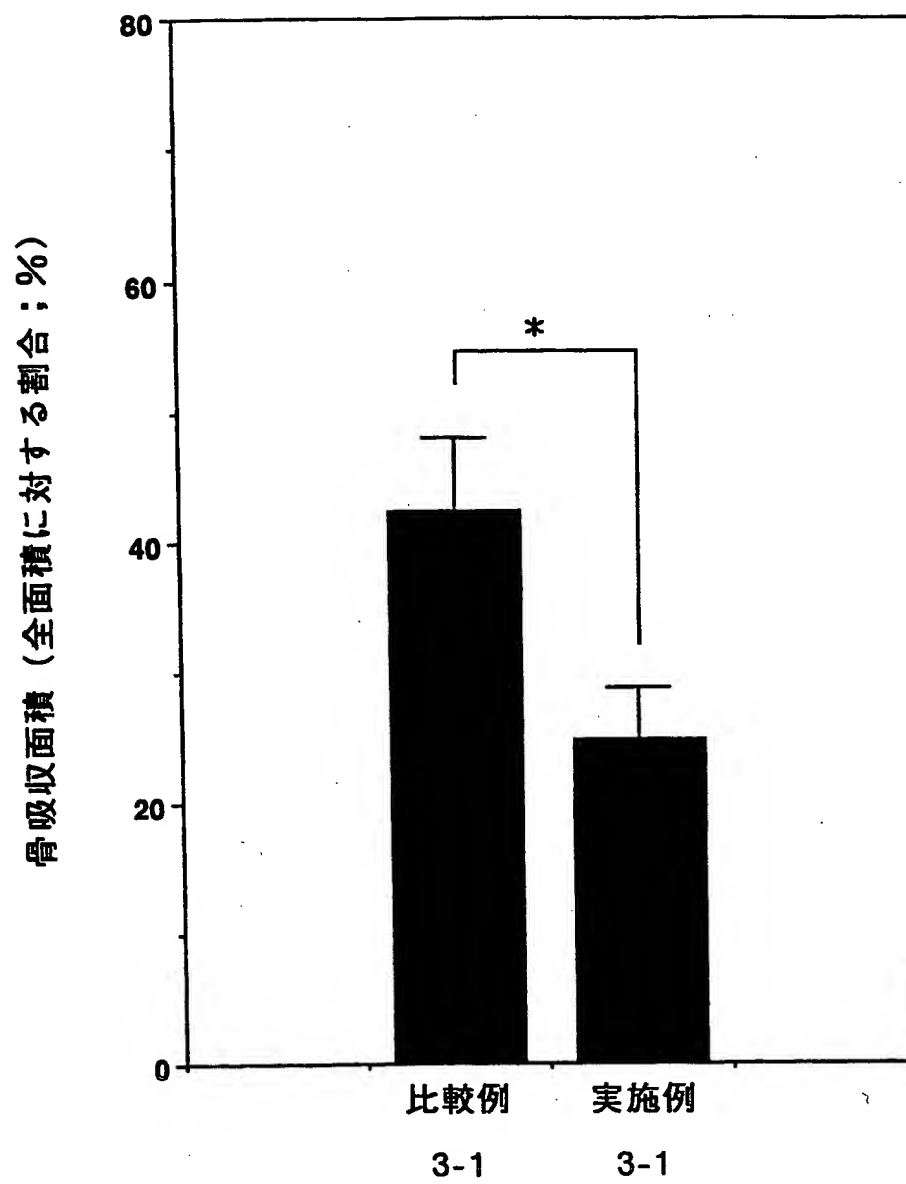


図 3

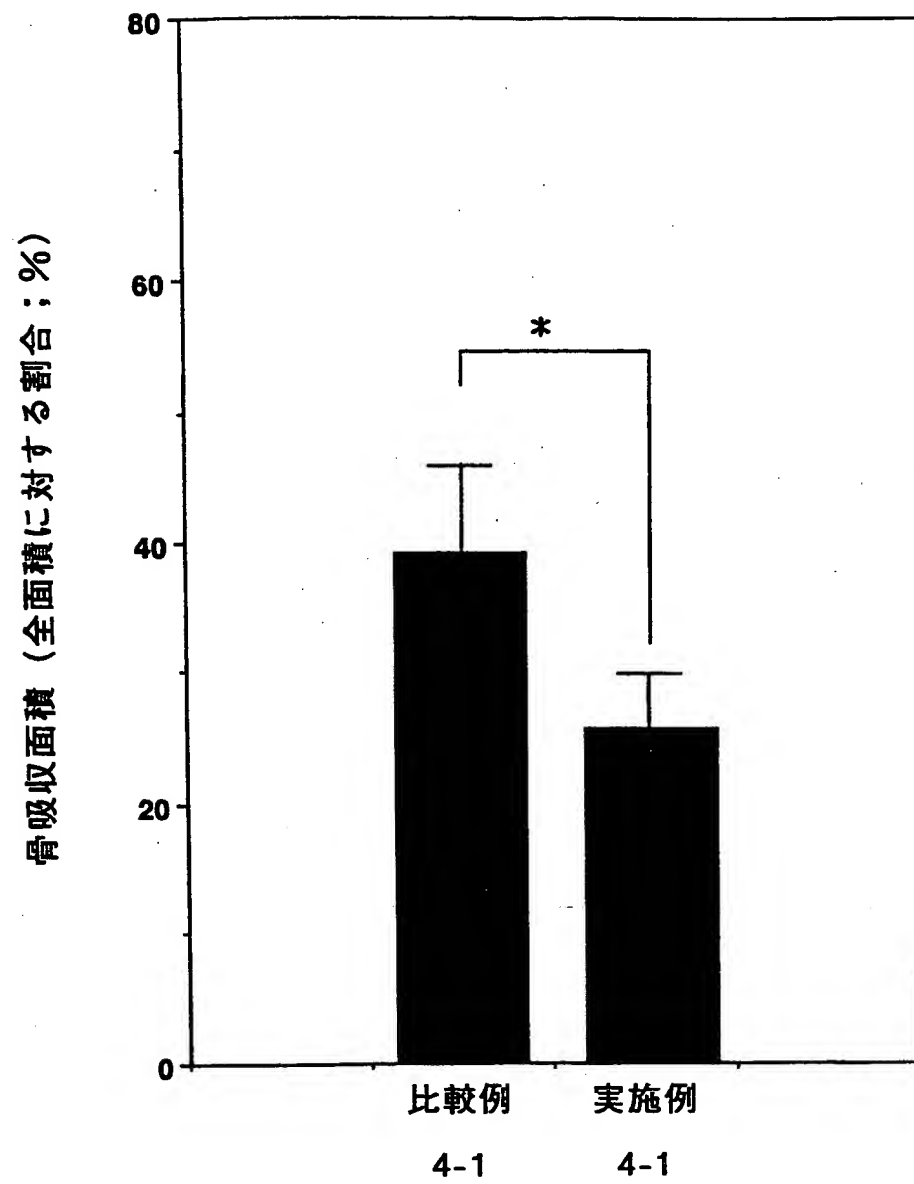


図4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04146

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 5/06 // A61N 7/00, A61P 19/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 5/00-5/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI/L (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE, JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO, 99/67289, A1 (EXOGEN INC.), 29 December, 1999 (29.12.99) & JP, 2000-004875, A	1-6
A	EP, 861663, A2 (HAYASHIBARA BIOCHEM. LAB.), 02 September, 1998 (02.09.98) & JP, 10-236974, A	1-6
A	EP, 816380, A1 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.), 07 January, 1998 (07.01.98) & WO, 96/26217, A1	1-6
A	TAKAHASHI, N. et al., "A New Member of Tumor Necrosis Factor Ligand Family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, Regulates Osteoclast Differentiation and Function.", Biochem. Biophys. Res. Commun. (March, 1999) Vol.256, No.3, pp.449-455	1-6
A	JP, 6-141850, A (Hitachi, Ltd.), 24 May, 1994 (24.05.94) (Family: none)	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
24 August, 2000 (24.08.00)Date of mailing of the international search report  
05 September, 2000 (05.09.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C12N 5/06 // A61N 7/00, A61P 19/08		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C12N 5/00-5/28		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI/L(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE, JICSTファイル(JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	WO, 99/67289, A1 (EXOGEN INC.) 29. 12月. 1999 (29. 12. 99) & JP, 2000-004875, A	1-6
A	EP, 861663, A2 (HAYASHIBARA BIOCHEM. LAB.) 2. 9月. 1998 (02. 09. 98) & JP, 10-236974, A	1-6
A	EP, 816380, A1 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.) 7. 1月. 1998 (07. 01. 98) & WO, 96/26217, A1	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	24. 08. 00	国際調査報告の発送日 05.09.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内田 俊生 印	4N 2937
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TAKAHASHI, N. et al. "A New Member of Tumor Necrosis Factor Ligand Family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, Regulates Osteoclast Differentiation and Function.", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1999, Mar.) Vol. 256, No. 3, p. 449-455	1-6
A	JP, 6-141850, A (株式会社日立製作所) 24. 5月. 1994 (24. 05. 94) (ファミリーなし)	1-6



P C T

## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT 18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 T-410	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPO0/04146	国際出願日 (日.月.年) 23.06.00	優先日 (日.月.年) 05.10.99	
出願人 (氏名又は名称) 帝人株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT 18条) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5: 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 5/06 // A61N 7/00, A61P 19/08

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 5/00-5/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/L(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE, JICSTファイル(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	WO, 99/67289, A1 (EXOGEN INC.) 29. 12月. 1999 (29. 12. 99) & JP, 2000-004875, A	1-6
A	EP, 861663, A2 (HAYASHIBARA BIOCHEM. LAB.) 2. 9月. 1998 (02. 09. 98) & JP, 10-236974, A	1-6
A	EP, 816380, A1 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.) 7. 1月. 1998 (07. 01. 98) & WO, 96/26217, A1	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 08. 00

国際調査報告の発送日

05.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TAKAHASHI, N. et al. "A New Member of Tumor Necrosis Factor Ligand Family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, Regulates Osteoclast Differentiation and Function. ", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1999, Mar.) Vol. 256, No. 3, p. 449-455	1-6
A	JP, 6-141850, A (株式会社日立製作所) 24. 5月. 1994 (24. 05. 94) (ファミリーなし)	1-6